



⑪ Numéro de publication : **0 507 698 A1**

⑫

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

⑳ Numéro de dépôt : **92420065.2**

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup> : **C12N 15/82, C12N 15/29,**  
**C12N 5/10, C12N 1/21,**  
**C12N 9/10, A01H 5/00**

㉔ Date de dépôt : **04.03.92**

③① Priorité : **05.03.91 FR 9102873**

④③ Date de publication de la demande :  
**07.10.92 Bulletin 92/41**

⑧④ Etats contractants désignés :  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC NL**  
**PT SE**

⑦① Demandeur : **RHONE-POULENC AGROCHIMIE**  
**14-20, rue Pierre Baizet**  
**F-69009 Lyon (FR)**

⑦② Inventeur : **Leroux, Bernard**  
**11 rue de Vaubecour, Chazay**  
**F-69380 Lozanne (FR)**  
Inventeur : **Chaubet, Nicole**  
**13 A boulevard Wilson, Esc. C**  
**F-67000 Strasbourg (FR)**  
Inventeur : **Freyssinet, Georges**  
**21 rue de Nervieux**  
**F-69450 Saint Cyr au Mont d'Or (FR)**  
Inventeur : **Gigot, Claude**  
**13 A boulevard Wilson, Esc. C**  
**F-67000 Strasbourg (FR)**

⑦④ Mandataire : **Chretien, François et al**  
**RHONE-POULENC AGROCHIMIE Service**  
**P.I.D. 14-20 Rue Pierre Baizet**  
**F-69009 Lyon (FR)**

⑤④ **Promoteurs d'histone.**

- ⑤⑦ 1) Gène chimère pour conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide.  
2) Il comprend, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, une zone peptide de transit, une séquence codant pour la tolérance au glyphosate et une zone signal de polyadénylation, caractérisé en ce que la zone promotrice est constituée d'au moins un promoteur d'un gène végétal d'histone permettant l'expression de la protéine de tolérance herbicide dans les zones d'accumulation du glyphosate.  
3) production de plantes tolérantes au glyphosate.

**EP 0 507 698 A1**

La présente invention concerne de nouveaux promoteurs, de nouveaux gènes chimères les contenant et leur utilisation dans les plantes pour leur conférer une tolérance accrue à des herbicides. Elle concerne également les cellules végétales transformées à l'aide de ces gènes et les plantes transformées régénérées à partir de ces cellules ainsi que les plantes issues de croisements utilisant ces plantes transformées.

Le glyphosate, le sulfosate ou la fosamétine sont des herbicides systémiques à large spectre de la famille des phosphonométhylglycines. Ils agissent essentiellement comme inhibiteurs compétitifs de la 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EC 2.5.1.19) ou EPSPS vis à vis du PEP (phosphoenolpyruvate). Après leur application sur la plante, ils sont véhiculés dans la plante où ils s'accumulent dans les parties à croissance rapide, notamment les apex caulinaires et racinaires, provoquant l'altération jusqu'à la destruction des plantes sensibles.

L'EPSPS plastidiale, cible principale de ces produits est une enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques, qui est codée par un ou des gènes nucléaires et synthétisée sous forme d'un précurseur cytoplasmique puis importée dans les plastides où elle s'accumule sous sa forme mature.

La tolérance des plantes au glyphosate et aux produits de la famille est obtenue par introduction stable dans leur génome d'un gène d'EPSPS d'origine végétale ou bactérienne mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par le glyphosate du produit de ce gène. Étant donné le mode d'action du glyphosate, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ce gène de façon à permettre son accumulation importante dans les plastides.

Il est connu, par exemple d'après le brevet américain 4 535 060, de conférer à une plante une tolérance à un herbicide du type ci-dessus, en particulier la N-phosphonométhylglycine ou glyphosate, par introduction dans le génome des plantes d'un gène codant pour une EPSPS portant au moins une mutation rendant cette enzyme plus résistante à son inhibiteur compétitif (le glyphosate), après localisation de l'enzyme dans le compartiment plastidial. Ces techniques demandent cependant à être améliorées pour obtenir une plus grande fiabilité dans l'emploi de ces plantes en conditions agronomiques.

Dans la présente description, on entend par "plante" tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse et par "cellule végétale" toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals ou des tissus différenciés tels que des embryons ou des parties de plantes des plantes ou des semences.

La présente invention a pour objet la production de plantes transformées ayant une tolérance accrue aux herbicides en général et particulièrement à ceux de la famille des phosphonométhylglycines par régé-

nération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces herbicides. L'invention concerne également ces nouveaux gènes chimères ainsi que des plantes transformées plus tolérantes en raison d'une meilleure tolérance des parties à croissance rapide ainsi que les plantes issues de croisements utilisant ces plantes transformées. Elle a également pour objet de nouveaux promoteurs pour la construction des gènes chimères ci-dessus.

Plus particulièrement l'invention a pour objet un gène chimère pour conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide ayant pour cible l'EPSPS, comprenant, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, une zone peptide de transit, une séquence codant pour une enzyme de tolérance au glyphosate et une zone signal de polyadénylation, caractérisé en ce que la zone promotrice est constituée d'au moins un fragment d'un promoteur d'un gène d'histone végétal permettant l'expression préférentielle de la protéine de tolérance herbicide dans les zones d'accumulation du glyphosate.

Le gène d'histone provient d'une plante monocotylédone telle que par exemple le blé, le maïs ou le riz ou de préférence d'une plante dicotylédone telle que par exemple la luzerne, le tournesol, le soja, le colza ou de préférence *Arabidopsis thaliana*. Cf Plant Mol. Biol. Vol 8, 1987 p 179-191 Chaboute et al.

On utilise de préférence un gène d'histone du type H3 ou de préférence H4, seuls ou sous une forme multiple, en particulier double.

La zone promotrice du gène chimère selon l'invention peut comprendre en outre avantageusement au moins un fragment d'un promoteur d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes c'est à dire, par exemple un promoteur d'origine virale tel que le promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV35S) ou d'origine végétale tels que la petite sous unité du gène de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO) d'une culture comme par exemple le maïs ou le tournesol.

La zone peptide de transit comprend, dans le sens de la transcription, au moins un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, de préférence le gène de la RuBisCO.

Les peptides de transit ci-dessus utilisables dans la zone de peptide de transit peuvent être en soi connus, d'origine végétale, par exemple issus de maïs, de tournesol, de pois, de tabac ou autres. Le premier et le second peptide de transit peuvent être identiques, analogues ou différents. Ils peuvent en outre comprendre chacun une ou plusieurs unités peptide de transit.

La partie de séquence de la partie mature N terminale est issue d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, comme par exemple un gène de maïs, de tournesol, de pois ou autres, l'espèce végétale d'origine pouvant être identique, analogue ou différente de celle dont sont issus respectivement le premier et le second peptide de transit. Par ailleurs la partie de séquence de la partie mature peut comprendre un nombre variable d'acides aminés, généralement de 15 à 40, de préférence de 18 à 33.

La construction de l'ensemble de la zone de peptide de transit peut être de manière en soi connue, notamment par fusion ou tout autre moyen convenable. Cette zone caractéristique a comme rôle de permettre le relargage d'une protéine mature avec une efficacité maximale, de préférence sous forme native.

La séquence codante pour la tolérance herbicide utilisable dans le gène chimère selon l'invention code pour une EPSPS mutée ayant un degré de tolérance au glyphosate. Cette séquence obtenue notamment par mutation du gène EPSPS peut être d'origine bactérienne, par exemple issu de *Salmonella typhimurium* (et nommée dans la suite "gène AroA"), ou végétale, par exemple de pétunia ou de tomate. Cette séquence peut comprendre une ou plusieurs mutations, par exemple la mutation Pro. 101 en Ser. ou encore les mutations Gly 96 en Ala.

La zone signal de polyadénylation, non traduite en 3' du gène chimère selon l'invention peut être d'origine quelconque, par exemple bactérienne telle que celle du gène de nopaline synthase, ou végétale telle que celle de la petite sous unité de la RuBisCO du maïs ou du tournesol.

Le gène chimère selon l'invention peut comprendre, en plus des parties essentielles ci-dessus, une zone intermédiaire non traduite (linker) entre la zone promotrice et la séquence codante et qui peut être d'origine quelconque, bactérienne, virale ou végétale.

#### EXEMPLE 1: CONSTRUCTION D'UN GENE CHIMERE :

On effectue la construction d'un gène chimère selon l'invention à partir des éléments:

1) Promoteur: on isole le promoteur à partir d'un clone respectivement d'histone H4 A777 et d'histone H4 A748 d'*Arabidopsis thaliana* race Strasbourg décrits par Chaboute (thèse de l'Université de Strasbourg 1987 et *PLant Mol. Biol.* Vol 8, 1987 p 179-191). Ces promoteurs, comprenant environ 1kpb entre les sites XhoI utilisés pour l'isoler, sont utilisés tels que ou sous forme dupliquée ou fusionnée avec un promoteur de CaMV35S seul ou double, c'est à dire dont une partie a été dupliquée.

2) Zone de transfert: les deux peptides de transit ainsi que les éléments de protéines matures uti-

lisés proviennent de l'ADNc cloné de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs correspondant au gène décrit par Lebrun *et al* (1987) et de l'ADNc cloné de la petite sous unité de la RuBisCO de tournesol isolé par Waksman *et al* (1987). Plus précisément, la zone de transfert comprend, dans le sens de la traduction:

- un peptide de transit de la petite sous unité de la RuBisCO de tournesol,
- une séquence de 22 acides aminés de la partie mature N terminale de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs,
- un peptide de transit de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs.

D'autres gènes analogues peuvent contenir respectivement des séquences de 10 à 40 et de préférence de 18 et 33 acides aminés.

Afin de fournir un élément comparatif, une autre construction a été effectuée contenant, dans le sens de la transcription "promoteur double CaMV35S/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence N terminale de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos" (pRPA-BL 410).

3) Gène de structure: il provient du gène muté (Pro 101 en Ser) de l'EPSPS de *Salmonella typhimurium* isolé par Stalker *et al* (1985). Le clone pMG34-2 (fourni par Calgene) a été linéarisé par XbaI puis traité à la nucléase de *Vigna radiata*. Après recoupe par SmaI les deux extrémités franches ont été ligaturées. Le clone obtenu possède un site NcoI sur l'ATG initiateur ainsi qu'un site Sall à 17pb en aval du codon stop. Ce clone a été nommé pRPA-BL 104.

4) Zone signal de polyadénylation: le fragment provient du gène de la nopaline synthase de pTi37 (Bevan *et al*, 1983). Ce site est contenu dans un fragment MboI de 260pb (Fraley *et al*, 1983; demande de brevet PCT 84/02913) qui a été traité par la polymérase de Klenow et cloné dans le site SmaI de M13 mp 18 pour introduire des sites BamHI et EcoRI respectivement aux extrémités 5' et 3'.

Après coupure par BamHI et traitement à la nucléase de *Vigna radiata* puis coupure EcoRI et traitement par la polymérase de Klenow, le fragment résultant a été introduit dans le vecteur p-BL 20 (cf demande de brevet français 88/04130) coupé par XbaI et BamHI traités à la polymérase de Klenow. Après recoupe par Sall et SstI, on obtient un fragment d'environ 0,4kpb contenant la séquence nos 3' du côté du site Sal I et la bordure droite de l'ADN-T du côté du site SstI.

L'assemblage de tous ces éléments a été effectué de la façon suivante:

Fusion" peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA":

Le peptide de transit de la PSU du gène de la RuBisCO de maïs provient d'un fragment EcoRI-SphI de 192pb issu de l'ADNc correspondant au gène de la PSU du gène de la RuBisCO de maïs, décrit par Lebrun et al(1987), possédant un site NcoI recouvrant le codon initiateur de la traduction et un site SphI correspondant au site de clivage du peptide de transit.

Par traitement de l'extrémité SphI avec la polymérase du bactériophage T4 et en la ligaturant avec l'extrémité NcoI, traitée à la polymérase de Klenow, du gène AroA de pRPA-BL 104 recoupé EcoRI, on obtient la fusion traductionnelle entre le peptide de transit de maïs et le gène de l'EPSPS bactérienne.

Fusion peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/séquence de 22 acides aminés de la partie mature du gène de maïs/ gène AroA:

De façon similaire un fragment EcoRI-HindIII de 228bp de l'ADNc de la PSU du gène de la RuBisCO de maïs est ligaturé avec l'extrémité NcoI traitée à la polymérase de Klenow du gène AroA de pRPA-BL 104 et recoupé par EcoRI. On obtient une fusion traductionnelle entre le peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs, les 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs et le gène de l'EPSPS bactérienne.

Peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol:

Le fragment est issu de l'ADNc isolé par Waksman et Freyssinet(1987). Un site SphI a été créé selon la méthode de Zoller et Smith (1984) au site de clivage du peptide de transit. Le peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol ainsi obtenu est un fragment EcoRI-SphI de 171 pb.

Fusion peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de maïs/ gène AroA:

La construction contenant la fusion peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs a été coupée par EcoRI-SphI puis mis en ligation avec le fragment EcoRI-SphI de 171 pb correspondant au peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol. Une construction résultante présente une substitution des fragments EcoRI-SphI et est une fusion traductionnelle "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA.

Le fragment EcoRI-Sall a été ligaturé avec le

fragment Sall-SstI contenant la séquence nos 3' et la bordure droite de l'ADN-T. Le fragment EcoRI-SstI résultant comprenant "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos 3'/Bordure droite ADN-T" est substitué au fragment EcoRI-SstI contenant la bordure droite de l'ADN-T du plasmide 150 A alpha 2 contenant le promoteur double CaMV. La fusion transcriptionnelle "double CaMV/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos 3' dans le vecteur 150 A alpha 2 a été nommé pRPA-BL 294.

Fusion"peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA":

La construction ci-dessus est coupée par NcoI-HindIII libérant le gène AroA. Puis elle est mise en ligation avec un fragment NcoI-Hind III de 1,5kpb contenant la fusion "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA". Une construction résultante présente une substitution des fragments NcoI-HindIII et est une fusion traductionnelle "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA".

Le fragment EcoRI-Sall a été ligaturé avec le fragment Sall-SstI contenant la séquence nos 3' et la bordure droite de l'ADN-T. Le fragment EcoRI-SstI résultant comprenant "peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos 3'/Bordure droite ADN-T" est substitué au fragment EcoRI-SstI contenant la bordure droite de l'ADN-T du plasmide 150 A alpha 2 contenant le promoteur double CaMV. La fusion transcriptionnelle "double CaMV/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos 3' dans le vecteur 150 A alpha 2 a été nommé pRPA-BL 410.

Toutes les constructions ont été obtenues par substitution de la zone promotrice double CaMV de la construction pRPA-BL 410 obtenue ci dessus, coupée en EcoRI-HindIII par un fragment HindIII-EcoRI contenant les différents éléments de promoteurs suivants:

A) Promoteur d'histone simple H4 A748 :

Un fragment XhoI-XhoI d'environ 1 kpb contenant le promoteur d'histone H4 748 d'*Arabidopsis thaliana* cf PLant Mol.Biol. Vol. 8, 1987 p 179-191 a été liga-

turé avec pUC 19 coupé par Sall. Ce clone a ensuite été coupé par XbaI traité à la polymérase de Klenow et EcoRI traité à la polymérase de Klenow puis ligaturé en condition favorisant la recircularisation. Le fragment HindIII-EcoRI contenant le promoteur histone a été substitué au fragment Hind III-EcoRI contenant le promoteur double CaMV de pRPA-BL 410.

Le clone résultant contient "promoteur d'histone H4/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos" et a été nommé pRPA-BL 498.

#### B) Promoteur d'histone simple H4 777

Un fragment XhoI de 1 kpb environ contenant l'ensemble des régions 5' proximale du gène d'histone H4 777 d'*Arabidopsis thaliana* cf Plant Mol.Biol. Vol.8, 1987 p 179-191 a été cloné au site Sal I du plasmide pUC 19 dans une orientation telle que les sites du polylinker de pUC 19 de XbaI à EcoRI soit situés en aval du site d'initiation de la transcription.

#### Fusion zone de transit de PSU de RuBisCO de tournesol/AroA

Un fragment EcoRI - Hinc II de l'ADNc de la PSU de RuBisCO de tournesol isolé par Waksman et Freyssinet (1987) codant pour le peptide de transit et 30 acides aminés de la protéine mature a été cloné aux sites EcoRI et Sma I de pUC 18.

Un fragment EcoRI-XbaI a été isolé et inséré en amont du gène AroA de pMG 34-2 (fourni par Calgene) aux sites EcoRI et XbaI. Afin de mettre en phase les 2 régions codantes, l'insert EcoRI-Hind III de ce clone a été inséré dans M13 mp19 aux sites EcoRI et Hind III.

La forme répliquative de l'ADN de ce clone a été linéarisé par XbaI puis traité par la nucléase de *Vigna radiata*. Après ligation dans des conditions favorisant la recircularisation et transformation, l'ADN de certains clones a été analysé par séquençage. Un des clones obtenu réalise une fusion traductionnelle entre l'élément de PSU de RuBisCO et le fragment AroA, le codon initiateur ATG de ce dernier étant perdu. La séquence de la jonction entre ces deux éléments est la suivante :

GAC GGGGATCCGGAA  
PSU Linker AroA.

Cette fusion comporte donc dans le sens de la traduction : peptide de transit de la PSU de RuBisCO de tournesol/30 acides aminés de la partie mature de la PSU de RuBisCO de tournesol/3 acides aminés correspondant au linker intermédiaire/AroA.

#### Construction de pRPA - BL - 240

Le plasmide comprenant le promoteur du gène histone H4 777 décrit ci-dessus a été coupé par XbaI, traité par la polymérase de Klenow et le fragment résultant de la recoupeure par Hind III, isolé. Le plasmide contenant la fusion peptide de transit de tournesol/AroA décrite ci-dessus a été coupé par EcoRI, traité par la polymérase de Klenow et le fragment résultant de la recoupeure par Hind III isolé. Ces deux fragments ont été mis en ligation en présence de pUC 19 coupé par Hind III. Un des clones résultant présente la structure suivante : promoteur histone/zone codant pour le peptide de transit de la PSU de RuBisCO de tournesol/zone codant pour 30 acides aminés de la partie mature de la PSU de la RuBisCO de tournesol/zone codant pour 3 acides aminés correspondant au linker intermédiaire/zone codant pour AroA.

Ce clone a été coupé par Sal I, traité par la polymérase de Klenow, puis après recoupeure par Hind III le fragment isolé a été ligaturé avec le plasmide contenant la zone de polyadénylation coupé par Bam HI, traité par la polymérase de Klenow, puis recoupé par Hind III.

Un des clones résultant présente la structure suivante : promoteur histone/zone codant pour le peptide de transit de la PSU de RuBisCO de tournesol/zone codant pour 30 acides aminés de la partie mature de RuBisCO de tournesol/zone codant pour 3 acides aminés correspondant au linker intermédiaire/zone codant pour AroA/nos3'.

Le plasmide ci-dessus a été linéarisé par Hind III et inséré au site unique Hind III du vecteur pRPA-BL 127 construit de la façon suivante : le vecteur pCGN 1152 possédant un gène de résistance à l'hygromycine sous contrôle du gène de la mannopine synthase et du terminateur du gène Tml (fourni par Calgene) a été digéré par Hind III et religaturé sur lui même, conduisant à la création d'un site unique de clonage Hind III.

Un des clones résultant comporte la fusion transcriptionnelle suivante en partant de la bordure gauche de l'ADN-T du plasmide pRPA-BL 127 : promoteur histone/zone de transit de PSU de RuBisCO de tournesol/AroA/nos3' et a été nommé pRPA-BL-240.

#### C) Duplication du promoteur d'histone (= promoteur double histone).

Le promoteur histone H4 dans pUC 19 décrit ci-dessus a été dirigé par NdeI, traité par la polymérase de Klenow, puis recoupé par Hind III. Le fragment éliminé a été substitué par un fragment Hind III - EcoRV purifié par digestion du plasmide portant le promoteur histone H4. Un des clones obtenu a la structure suivante : zone 5' du promoteur H4 de Hind III à Nde I de 530 pb, zone dupliquée correspondant à deux fragments de 330 pb de NdeI à EcoRV directement répé-

tés, zone 3' du promoteur H4 de EcoRV à EcoRI de 140 pb.

Le fragment Hind III-EcoRI contenant le promoteur double histone a été substitué au fragment Hind III-EcoRI contenant le double CaMV de pRPA-BL 410. Le clone résultant contient "double promoteur histone/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de maïs/gène AroA/nos" et a été nommé pRPA-BL 488.

#### D) Promoteur hybride double CaMV/histone:

Le promoteur histone H4 A748, dans la cassette HindIII-EcoRI décrite ci-dessus (promoteur histone simple H4 A748), est coupé AccI, traité à la polymérase de Klenow puis coupé EcoRI. Le fragment résultant de 580 pb est ligaturé avec le promoteur double CaMV coupé EcoRV-EcoRI. Le clone résultant comprenant la fusion double CaMV partie 3' du promoteur histone est coupé HindIII-EcoRI et substitué au fragment HindIII-EcoRI de pRPA-BL 410 comprenant le double CaMV. La construction résultante comprend "promoteur double CaMV/partie 3' promoteur histone/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de tournesol/séquence de 22 acides aminés de la PSU de la RuBisCO de maïs/peptide de transit de la PSU de la RuBisCO de maïs/gène AroA/nos" et a été nommé pRPA-BL 502.

#### EXEMPLE 2: RESISTANCE DES PLANTES TRANSFORMÉES

##### 1° Transformation:

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101 (Hood et al, 1987) porteuse du cosmide pTVK 291 (Komari et al, 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al (1985).

##### 2° Régénération:

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 1985, Vol 227, p. 1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30 g de saccharose contenant 0.05 mg d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormo-

ne, pendant 10 jours. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS dilué au demi à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre. Des plants de tabac PBD6 non transformés ont été pris au même stade à titre de témoins.

##### 3° Mesure de la tolérance au glyphosate:

les meilleures plantes issues de la régénération des tabacs transformés sont sélectionnées en serre après traitement des plantes, au stade 5 feuilles par pulvérisation avec une suspension aqueuse de glyphosate à une dose correspondant à 0,6 kg/ha de matière active. Les plantes sélectionnées ont été autofécondées et les graines semées sur milieu MS additionné de 30 g/l de sucrose et 200 µg/ml de kanamycine. Les graines issues de plantes présentant un ratio de ségrégation de 3/4 de plantes résistantes-1/4 de plantes sensibles ont été conservées. Une analyse par hybridation moléculaire a permis de déterminer les plantes n'ayant intégré qu'une copie de l'ADN-T. Par croisement et sélection, ces plantes ont été amenées à l'état hétérozygotes ou homozygotes. Ces plantes ont été semées en conditions naturelles de plein champ et pulvérisées au stade 5 feuilles avec une dose de 0,8 kg/ha de glyphosate (Round Up). Les résultats correspondants à l'observation d'indices de phytotoxicité relevés au bout de 30 jours après le traitement. Dans ces conditions on constate que les plants transformés par les constructions présentent une tolérance acceptable (pRPA-BL 240 et 410) voire bonne (pRPA-BL 488 et 502) alors que les plants témoins sont complètement détruits;

Ces résultats montrent clairement l'amélioration apportée par utilisation d'un gène chimère selon l'invention pour un même gène codant pour la tolérance au glyphosate.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être utilisées comme parents pour l'obtention de lignées et d'hybrides ayant une tolérance accrue au glyphosate.

#### Exemple 3

Des colzas de printemps, cultivar Westar, résistant au glyphosate, ont été obtenus en utilisant la technique de BOULTER et al., 1990 (Plant Science, 70: 91-99) avec les constructions pRPA-BL 488 (dH-At-PTO-aroA-nos), pRPA-BL 502 (CaMV/H-At-PTO-aroA-nos). Ces plantes ont résisté à un traitement en serre au glyphosate à 400 g m.a./ha, traitement qui détruit les plantes non transgéniques.

## Revendications

1) Séquence ADN pouvant servir de zone promotrice dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes, caractérisée en ce qu'elle comprend, dans le sens de la transcription, au moins un promoteur ou un fragment de promoteur d'un gène végétal d'histone permettant l'expression de la protéine de tolérance herbicide dans les zones d'accumulation dudit herbicide.

2) Séquence ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur d'histone provient d'une plante dicotylédone.

3) Séquence ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur d'histone provient d'*Arabidopsis thaliana*.

4) Séquence ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur d'histone provient d'une plante monocotylédone.

5) Séquence ADN selon la revendication 3, caractérisé en ce que le promoteur d'histone est un promoteur H4.

6) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la zone promotrice comprend un promoteur d'histone double.

7) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la zone promotrice comprend un promoteur d'histone associé à un promoteur différent issu d'un gène pouvant s'exprimer naturellement dans les plantes.

8) Gène chimère pour conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide, comprenant, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, une zone peptide de transit, une séquence codante pour la tolérance à l'herbicide et une zone signal de polyadénylation, caractérisé en ce que la zone promotrice comporte une séquence selon l'une des revendications 1 à 7.

9) Gène chimère selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'herbicide est le glyphosate.

10) Gène chimère selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'herbicide a pour cible l'EPSPS.

11) Gène chimère selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la séquence codante de la tolérance au glyphosate est d'origine bactérienne.

12) Gène chimère selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que la séquence codante de la tolérance au glyphosate est d'origine végétale.

13) Gène chimère selon l'une des revendications 8 à 12, caractérisé en ce que la zone peptide de transit comprend, dans le sens de la transcription, au moins une séquence ADN codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, éventuellement une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis éventuellement une séquence ADN co-

dant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.

14) Vecteur pour la transformation des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 8 à 13.

15) *Agrobacterium* sp. caractérisé en ce qu'elle contient un vecteur selon la revendication 14.

16) Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un gène chimère selon l'une des revendications 10 à 14.

17) Plante transformée de tolérance herbicide améliorée, caractérisée en ce qu'elle a été obtenue à partir d'une cellule selon la revendication 16.

18) Plante selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est une dicotylédone.

19) Plante selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est une monocotylédone.

20) Procédé de construction d'un gène chimère selon l'une des revendications 8 à 13, caractérisé en ce qu'on isole respectivement un promoteur d'histone selon l'une des revendications 1 à 5, au moins une zone de peptide de transit ainsi qu'au moins une séquence codant pour la tolérance herbicide et une zone signal de polyadénylation appropriée et que ensuite on les assemble dans le sens de la transcription du gène de tolérance.



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 92 42 0065

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
O,X	ABSTRACTS VIITH IAPTC CONGRESS Juin 1990, AMSTERDAM page 66; LEPETIT M., ET. AL.: 'Functional studies of plant histone gene promoters in plant protoplasts' * abrège A2-87 *	1-5	C12N15/82 C12N15/29 C12N5/10 C12N1/21 C12N9/10 A01H5/00
Y	WO-A-9 002 172 (CALGENE)  * page 2, ligne 3 - page 2, ligne 31 * * page 9, ligne 9 - page 10, ligne 14 *	8-12, 14-20	
Y	J. EXP. BOT. vol. 41, 1990, SUPPL. C1-4 ROST, T. L., ET. AL.: 'The distribution and characterization of cycling cells in root tips' * le document en entier *	8-12, 14-20	
Y	THE PLANT CELL vol. 2, no. 4, Avril 1990, pages 275 - 277; CROUCH, M. L.: 'Debating the responsibilities of plant scientists in the decade of the environment' * page 276, colonne de gauche, ligne 30 - ligne 33 *	8-12, 14-20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
A	PLANT MOL. BIOL. vol. 8, 1987, pages 179 - 191; CHABOUTE M. E., ET. AL.: 'Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of Arabidopsis thaliana' * le document en entier *	1-20	C12N A01H
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 29 JUIN 1992	Examineur MADDOX A. D.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES  X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1500 (01.82 (P0402))